

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



**No title available.**

Patent Number: DE19850186  
Publication date: 2000-05-25  
Inventor(s): KESSLER CHRISTOPH (DE); KASPER PIA (DE); HABERHAUSEN GERD (DE)  
Applicant(s):: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (DE)  
Requested Patent:  DE19850186  
Application Number: DE19981050186 19981030  
Priority Number(s): DE19981050186 19981030  
IPC Classification: C07H21/00  
EC Classification:  
Equivalents:  EP1124993 (WO0029611), A3,  WO0029611

**Abstract**

The invention relates to a method for the subtype and/or species-comprehensive detection of HI viruses in a sample while using at least one oligonucleotide which contains at least 10 successive nucleotides from (i) a highly preserved region of the LTR region, of the gag gene or of the pol gene of HIV, (ii) of a corresponding region of another HI virus isolate, (iii) of a corresponding region of a consensus sequence stemming from a plurality of HI virus isolates or of sequences complementary thereto.

Data supplied from the esp@cenet database - 12



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑯ ⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑯ ⑩ **DE 198 50 186 A 1**

⑯ Int. Cl. 7:  
**C 07 H 21/00**

⑯ ⑯ Aktenzeichen: 198 50 186.2  
⑯ ⑯ Anmeldetag: 30. 10. 1998  
⑯ ⑯ Offenlegungstag: 25. 5. 2000

⑯ ⑯ Anmelder:  
Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE  
⑯ ⑯ Vertreter:  
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München  
⑯ ⑯ Erfinder:  
Haberhausen, Gerd, Dr., 82393 Iffeldorf, DE; Kasper, Pia, Dr., 68305 Mannheim, DE; Kessler, Christoph, Dr., 82057 Icking, DE

⑯ ⑯ Entgegenhaltungen:

US 57 73 602  
EP 8 87 427 A2  
EP 8 39 917 A1  
EP 6 17 132 A2  
EP 4 03 333 A2  
WO 98 58 086 A2  
WO 98 27 425 A1  
WO 9 97 898 A1  
WO 9 62 557 A1  
WO 9 01 069 A1

Chem. Abstr. 130(1999)105838;  
Chem. Abstr. 130(1999)13032q;  
Chem. Abstr. 130(1999)11070b;  
Chem. Abstr. 128(1998)57866c;  
Chem. Abstr. 126(1997)55753y;  
Chem. Abstr. 117(1992)41503u;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ ⑯ Neue Primer und Sonden zum Nachweis von HIV  
⑯ ⑯ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von HIV-Viren in einer Probe unter Verwendung mindestens eines Oligonukleotids, welches mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus (i) einer hochkonservierten Region der LTR-Region, des gag-Gens oder des pol-Gens von HIV, (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HIV-Virusisolats, (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HIV-Virusisolaten stammenden Konsensussequenz, oder dazu komplementären Sequenzen enthält.

DE 198 50 186 A 1

DE 198 50 186

# DE 198 50 186 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum subtyp- oder/und speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren in einer Probe sowie dazu geeignete Oligonukleotide.

5 Der Nachweis von HIV ist von großer Bedeutung in der analytischen Diagnostik. Es existiert eine Anzahl von Nachweisverfahren, die auf der immunologischen Detektion von HIV-spezifischen Antikörpern, HIV-eigenen Proteinen, beispielsweise der Reversen Transkriptase, oder von HIV-spezifischen Nukleinsäuren beruhen.

Da HIV und dessen genetisches Material nur in sehr geringen Konzentrationen in Körperflüssigkeiten vorkommen, ist die Sensitivität der Nachweisverfahren ein wichtiger Faktor für die Verwendbarkeit solcher Verfahren.

10 Aus diesem Grund wird derzeit die PCR (Polymerase Chain Reaction), die auf einer Amplifikation der nachzuweisenden Nukleinsäuren beruht, in zunehmendem Maße verwendet. Anwendungen dieses Verfahrens zum direkten Nachweis von HIV sind beispielsweise in EP-B-0 200 362 und EP-B-0 201 184 beschrieben.

15 Die PCR oder Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten mit Hilfe von Oligonukleotiden, sogenannten Primern, die spezifisch mit den nachzuweisenden Nukleinsäuren hybridisieren. Dabei entstehen Amplifikationsprodukte, welche wiederum mit weiteren spezifischen Oligonukleotiden, sogenannten Sonden, detektiert werden können.

20 Voraussetzungen für eine erfolgreiche PCR zum Nachweis von HIV ist erstens eine möglichst genaue Übereinstimmung der komplementären Basenfolge der verwendeten Primer mit derjenigen der nachzuweisenden Nukleinsäure, damit die Hybridisierung möglichst spezifisch ist. Andererseits ist es jedoch auch vorteilhaft, möglichst viele Varianten von HIV mit denselben Primern amplifizieren zu können. Seit der Entdeckung des HIV-1 wurde festgestellt, dass die Nukleinsäuresequenzen von HI-Viren unterschiedlicher Provenienz sich unterscheiden. Die unterschiedlichen Typen von HIV-1 werden üblicherweise als Subtypen bezeichnet. Derzeit sind mindestens 9 Subtypen bekannt, die als Subtypen A bis H und O bezeichnet werden (Human Retroviruses and AIDS, Los Alamos, Natl. Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1994; Herausgeber G. Meyers et al., I-A-1). Bisher wurden noch keine Primer oder Sonden entwickelt, mit denen sämtliche bekannten Subtypen von HIV-1 erkannt werden können. Weiterhin wäre es von Vorteil, zusätzlich auch HIV-2 und dessen Subtypen mit denselben Primern und Sonden erkennen zu können. Von HIV-2 sind derzeit die Subtypen A, B, C und D bekannt.

25 In der europäischen Patentanmeldung EP 0 403 333 werden Primer und Sonden beschrieben, die jeweils mit Basensequenzen aus konservierten Regionen der gag-, vpr- und pol-Gene der HIV-1-Isolate Bru, Mal und Eli sowie mit den entsprechenden Regionen von HIV-2 ROD und SIV Mac hybridisieren. Weiterhin werden Primer und Sonden offenbart, die jeweils mit Abschnitten aus den env-, nef1-, vif1- und vpr-Genen von HIV-1 Bru, Mal und Eli hybridisieren, sowie solche, die mit Abschnitten aus den nef2-, vif2- und vpx-Genen von HIV-2 ROD und SIV Mac hybridisieren. Obwohl einige dieser Oligonukleotide offenbar speziesübergreifend hybridisieren, ist nichts darüber ausgesagt, welche Subtypen der einzelnen Viren erkannt werden.

30 35 In der europäischen Patentanmeldung EP 727 497 sind Primer und Sonden offenbart, die einen Sequenzabschnitt aus dem pol-Gen von HIV-1 amplifizieren und dadurch fünf Subtypen von HIV-1 erkennen können.

EP 0 617 132 offenbart ebenfalls Primer und Sonden zum Nachweis von HIV-1, die in der Lage sind, zwischen HIV-1 und seinen phylogenetisch nächsten Verwandten zu unterscheiden, wie etwa HTLV-II oder HIV-2. Die dort ausgewählten Oligonukleotide hybridisieren mit einer Reihe von Regionen aus dem HIV-Genom, einschließlich des LTR und der meisten Strukturgene.

40 45 Da es bisher noch kein Primerpaar gibt, welches für einen subtyp- oder/und speziesübergreifenden Nachweis geeignet ist, werden derzeit häufig mehrere Primerpaare zur Amplifikation eingesetzt. Dies führt jedoch einerseits zu erhöhten Reagenzkosten und andererseits zu einer erheblich komplexeren PCR.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung eines Verfahrens zum subtyp- oder/und speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren in einer Probe. Insbesondere war es eine Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem mehr Subtypen von HIV-1 und/oder HIV-2 detektiert werden können, als es bisher möglich war.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von Nukleinsäuren von HI-Viren in einer Probe durch Hybridisierung der Nukleinsäuren mit mindestens einem mit HIV-Nukleinsäuren spezifisch hybridisierenden Oligonukleotid, welches mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

50 (i) einer hochkonservierten Region der LTR-Region, des gag-Gens oder des pol-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,  
(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,  
55 (iii) einer entsprechenden Region einer Konsensussequenz aus mehreren HI-Virusisolaten,

oder dazu komplementären Sequenzen enthält.

Bevorzugt wird diese Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von Nukleinsäuren von HI-Viren in einer Probe durch  
60 Hybridisierung der Nukleinsäuren mit einer Oligonukleotidkombination, umfassend zwei oder mehr mit HIV-Nukleinsäuren spezifisch hybridisierende Oligonukleotide, die jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

65 (i) einer hochkonservierten Region der LTR-Region, des gag-Gens oder des pol-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,  
(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,  
70 (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten abgeleiteten Konsensussequenz,

oder dazu komplementären Sequenzen enthalten, und

## Durchführung eines Amplifikationsschrittes.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht den Nachweis von mehr Subtypen von HIV-1 und HIV-2 (subtypübergreifender Nachweis) als es im bisherigen Stand der Technik möglich war. Der subtypübergreifende Nachweis bedeutet, daß mindestens 2 Subtypen einer jeweiligen Spezies mit einer einzigen Sonde oder einer einzigen Oligonukleotidkombination detektiert werden können. Wie bereits oben erwähnt, ist es bisher nicht möglich gewesen, mit herkömmlichen Nachweisverfahren die Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H und O von HIV-1 mit einer einzigen Sonde oder einem einzigen Amplifikationsprimerpaar bestehend aus zwei Oligonukleotiden zu detektieren. Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird es nun möglich, mindestens 7 von 9 Subtypen von HIV-1, insbesondere einschließlich Subtyp O in Verbindung mit anderen Subtypen mit Hilfe besonders weniger und im besten Fall mit denselben Oligonukleotiden zu erkennen. In einer bevorzugten Ausführungsform können alle bisher bekannten 9 Subtypen erkannt werden. Von HIV-2 können mit dem subtypübergreifenden Nachweis mindestens 2, bevorzugt mindestens 3 und am meisten bevorzugt alle Subtypen A, B, C und D von HIV-2 erkannt werden. Zusätzlich zum subtypübergreifenden Nachweis können auch Nukleinsäuren von HIV-1 und HIV-2 speziesübergreifend detektiert werden. Speziesübergreifend bedeutet, daß verschiedene Spezies von Immunodefizienzviren mit denselben Oligonukleotiden erkannt werden, z. B. HIV-1 und HIV-2. Bevorzugt werden mindestens 7 der derzeit bekannten 9 Subtypen von HIV-1, sowie weitere der derzeit bekannten Subtypen von HIV-2 detektiert. Besonders bevorzugt können alle 9 Subtypen von HIV-1 plus weitere Subtypen von HIV-2, besonders bevorzugt plus alle derzeit bekannten Subtypen von HIV-2 detektiert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf einer Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten von HI-Viren mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden, die als Primer oder als Sonden fungieren können.

Ein Oligonukleotid ist ein einsträngiges lineares Nukleinsäuremolekül. Im Allgemeinen weisen Oligonukleotide 10 bis 100 Basen auf. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide sind bevorzugt 10 bis 80, besonders bevorzugt 10 bis 60, noch stärker bevorzugt 10 bis 30 und am meisten bevorzugt 20 bis 30 Nukleotide lang. Wie bei Nukleinsäuren unterscheidet man auch hier zwischen Oligodesoxyribonukleotiden und Oligoribonukleotiden, zu den Oligoribonukleotiden zählt man jedoch auch Verbindungen, bei denen der Wasserstoff der Hydroxygruppe durch organische Reste, beispielsweise eine Allylgruppe, ersetzt ist. Solche Verbindungen sind dem Fachmann seit längerem bekannt. Weiterhin können durch den Begriff "Oligonukleotid" beispielsweise auch Moleküle umfaßt sein, bei denen das Zuckerphosphatkopf durch ein Peptidrückgrat ersetzt ist. Diese Gruppe von Verbindungen wird PNA genannt. Allen Oligonukleotiden ist gemeinsam, dass sie am Rückgrat Basen aufweisen, welche zu Wasserstoffbrückenbindungen mit hierzu komplementären Basen in der Lage sind. Zu den Basen gehören die natürlichen Basen A, G, C, T und U, jedoch auch künstliche Basen, wie etwa Deaza-G.

Ein Oligonukleotidprimer ist ein Oligonukleotid, welches mit einer zweiten, ebenfalls einsträngigen Nukleinsäure hybridisieren kann und anschließend durch eine DNA-Polymerase entlang der als Matrize dienenden zweiten Nukleinsäure mit Nukleosidtriphosphaten ergänzt werden kann, sodass eine doppelsträngige Nukleinsäure entsteht. Normalerweise besitzt der Primer daher an seinem 3'-Ende, d. h. an dem Ende, an dem Nukleotidbausteine angesetzt werden, am 3'-C-Atom des Zuckers eine Hydroxylgruppe.

Eine Oligonukleotidkombination umfaßt mehrere Oligonukleotide, bevorzugt umfaßt sie ein Primerpaar oder eine Kombination aus Primern und Sonden, wie etwa ein Primerpaar und eine Sonde. Ein Primerpaar besteht aus zwei Oligonukleotidprimern, welche die Amplifikation eines bestimmten Abschnittes einer Nukleinsäure erlauben. Bevorzugt hybridisieren die beiden Primer des Primerpaars mit unterschiedlichen Strängen der Ursprungsnukleinsäure dergestalt, dass die jeweiligen Verlängerungsprodukte einander überlappen. Dies führt dann dazu, dass jeder der Primer mit dem Verlängerungsprodukt des jeweils anderen Primers hybridisieren kann und ein Abschnitt, der zwischen den beiden Primern liegt, als Amplifikationsprodukt vervielfacht wird. Sogenannte Sonden sind ebenfalls einsträngige Oligonukleotide, die zwar auch als Primer fungieren können, aber hauptsächlich dafür vorgesehen sind, mit bereits amplifizierten Nukleinsäureabschnitten spezifisch zu hybridisieren, um somit einen Nukleinsäurenachweis zu ermöglichen. Die Bezeichnung "Oligonukleotid" umfasst somit die Begriffe Primer und Sonde, die sich lediglich ihrer Funktion nach unterscheiden. Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Oligonukleotide können auch Markierungsgruppen enthalten, wie etwa radioaktive Marker oder Fluoreszenzmarker. Insbesondere sind es die Sonden, die Markierungen aufweisen.

Unter Amplifikation wird die Vervielfältigung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäureabschnitten verstanden. Ein bekanntes Amplifikationsverfahren ist die eingangs erwähnte PCR. Bei diesem Verfahren wird zunächst ein normalerweise doppelsträngiges DNA-Molekül denaturiert, d. h. in seine Einzelstränge aufgespalten. Dann werden die Amplifikationsprimer unter Bedingungen hinzugegeben, die eine Hybridisierung der Primer mit der Ziel-DNA-Sequenz erlauben. Mit Hilfe eines Polymeraseenzym's sowie Nukleotidbausteinen werden dann die Primer entlang der Nukleinsäurematrize ergänzt. Anschließend werden die neu gebildeten doppelsträngigen Nukleinsäuren wieder denaturiert und es beginnt ein neuer Polymerasezyklus. Herkömmliche PCR-Verfahren verwenden typischerweise zwischen 25 und 40 Zyklen. Eine Amplifikation im Sinne der Erfindung kann also auch nötige Vorbereitungsschritte zur Nukleinsäureamplifikation mit einschließen, wie z. B. das Denaturieren der doppelsträngigen DNA.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet hierin die Vereinigung zweier komplementärer Nukleinsäureeinzelstränge zu einem Doppelstrang. Dazu müssen die Einzelstränge nicht 100% komplementär sein, sondern können Abweichungen in der Basenfolge aufweisen. Um eine für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Hybridisierung zu erreichen, müssen die Einzelstränge, in diesem Fall die Oligonukleotide, unter den herrschenden Hybridisierungsbedingungen jedoch hinreichend spezifisch sein.

Um die eingangs genannten Vorteile des hier beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens zu gewährleisten, müssen die verwendeten Oligonukleotide zumindest zwei Bedingungen erfüllen. Sie müssen einerseits spezifisch genug sein, um ausschließlich mit Nukleinsäuren zu hybridisieren, die von HI-Viren stammen. Andererseits variieren gerade diese Viren in einigen Genomregionen sehr stark, d. h. dass relativ große Unterschiede in der Basensequenz vorliegen. Aufgrund dieser Unterschiede unterscheidet man einerseits zwischen HIV-1 und HIV-2 als auch zwischen sogenannten Subtypen, die relativ eng verwandte Stämme desselben Virus darstellen. Bezogen auf die Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung bedeutet dies, dass diese außerdem in der Lage sein müssen, nicht nur ein bestimmtes Virus oder einen bestimmten Sub-

# DE 198 50 186 A 1

typ zu erkennen, sondern sie müssen eine Basensequenz aufweisen, die eine Hybridisierung mit möglichst vielen oder sogar allen bekannten Subtypen von HIV-1 oder von HIV-2 oder sogar von beiden erlaubt.

Zu diesem Zweck wählt man normalerweise die Oligonukleotide aus relativ konservierten Regionen des Genoms der nachzuweisenden Viren aus und verwendet dann die jeweilige Komplementärsequenz. Aus dem Stand der Technik sind 5 bereits einige hochkonservierte Regionen bekannt (siehe oben). Konservierte Regionen sind Nukleinsäureabschnitte auf dem Genom von HIV, die im Vergleich zum Rest des Genoms nur sehr geringe Unterschiede in der Basensequenz aufweisen. In diesem Zusammenhang spricht man auch von Basenidentität, die in Prozent ausgedrückt wird, oder von Homologie.

Überraschenderweise wurden nun in der vorliegenden Erfindung Oligonukleotide gefunden, die sowohl einen subtyp- 10 übergreifenden Nachweis als auch einen speziesübergreifenden Nachweis von HIV ermöglichen. Diese Oligonukleotide hybridisieren mit neu entdeckten hochkonservierten Regionen von HIV. Diese befinden sich in der LTR-Region, dem gag- und dem pol-Gen. Diese Regionen sind relativ klein, sie erlauben mit einer durchschnittlichen Länge von 50 bis 100 Nukleotiden jedoch die Hybridisierung mit einem oder mehreren Oligonukleotiden. Die Festlegung der Regionen des 15 HIV-Genoms basiert hierin, wie auch in den meisten zitierten Dokumenten des Stands der Technik, auf der Nummerierung des HIV-1-Isolats HXB2, wie veröffentlicht in: Wong-Staal et al., Nature 313, 277-284 (1985). Die Sequenzen dieser neuen hochkonservierten Bereiche sind jeweils in den SEQ ID NO. 1 bis 13 angegeben, deren Sequenzen sich auf die Sequenz von HIV-1 HXB2, Zugangsnummer K03455 der HIV Sequence Data Base (<http://HIV-web.lanl.gov/>) beziehen. Die Lage der hochkonservierten Sequenzen ist wie folgt:

SEQ ID NO. 1: LTR-Region, Position 504-565, Länge 62 Nukleotide  
20 SEQ ID NO. 2: gag-Gen, Position 761-822, Länge 62 Nukleotide  
SEQ ID NO. 3: gag-Gen, Position 1786-1847, Länge 62 Nukleotide  
SEQ ID NO. 4: pol-Region, Position 2307-2360, Länge 54 Nukleotide  
SEQ ID NO. 5: pol-Gen, Position 2376-2434, Länge 59 Nukleotide  
SEQ ID NO. 6: pol-Gen, Position 2568-2632, Länge 65 Nukleotide  
25 SEQ ID NO. 7: pol-Gen, Position 3093-3145, Länge 53 Nukleotide  
SEQ ID NO. 8: pol-Gen, Position 4131-4207, Länge 77 Nukleotide  
SEQ ID NO. 9: pol-Gen, Position 4333-4399, Länge 67 Nukleotide  
SEQ ID NO. 10: pol-Gen, Position 4638-4696, Länge 59 Nukleotide  
SEQ ID NO. 11: pol-Gen, Position 4884-4984, Länge 101 Nukleotide  
30 SEQ ID NO. 12: pol-Gen, Position 5034-5095, Länge 62 Nukleotide  
SEQ ID NO. 13: pol-Gen, Position 4410-4506, Länge 97 Nukleotide.

Die erfindungsgemäß geeigneten Oligonukleotide weisen bevorzugt Basensequenzen auf, die innerhalb der oben genannten hochkonservierten Regionen oder deren Komplementärsequenzen liegen.

Der Begriff "überlappen" soll hierin so verstanden werden, daß die erfindungsgemäßen Oligonukleotide jeweils mit 35 mindestens 10 aufeinanderfolgenden Basen aus einer der hochkonservierten Regionen überlappen.

Bevorzugt überlappen die Oligonukleotide mit jeweils einer der Regionen mit den SEQ ID NO: 4, 5, 9, 10 und 13, bevorzugt 4, 5, 9 und 10. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform überlappen die Oligonukleotide mit jeweils einer der Regionen mit den SEQ ID NO: 6, 8, 10, 11 und 13.

Obwohl die hochkonservierten Regionen in Bezug auf ein einziges HIV-1-Virusisolat angegeben sind, weist natürlich 40 der Begriff "hochkonservierte Region" über eine einzige spezifische Sequenz hinaus und umfasst somit alle entsprechenden Regionen von verschiedenen HIV-Stämmen oder -Isolaten, die mit HIV-1 oder mit HIV-2 verwandt sind. Erfindungsgemäß geeignete Oligonukleotidsequenzen können auch eine Basensequenz aufweisen, die eine Konsensussequenz aus hochkonservierten Regionen von mehreren HI-Virusisolaten oder -stämmen darstellt. D. h. dass beispielsweise eine Basenabfolge von mehreren Basen einem HI-Virusisolat entspricht und eine weitere Basenabfolge im selben 45 Oligonukleotid einem anderen HI-Virusisolat entspricht. Das Oligonukleotid enthält dann heterologe Basenfolgen. Bevorzugt umfassen die Oligonukleotide jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus einer der zuvor genannten Regionen. Stärker bevorzugt enthalten sie 15 bis 30 solcher Nukleotide.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst mindestens die folgenden Schritte:

50 (a) Inkontaktbringen einer Probe mit dem/den Oligonukleotid(en) unter Bedingungen, bei denen eine Hybridisierung des/der Oligonukleotide(s) mit in der Probe vorhandenen HIV-Nukleinsäuren, ausgewählt aus HIV-1 oder/und HIV-2, erfolgt,  
(b) Bestimmen des Vorhandenseins oder/und der Menge von HIV-Nukleinsäuren in der Probe.

55 In Schritt (b) wird bevorzugt ein Amplifikationsschritt durchgeführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung wird der subtyp- oder/und speziesübergreifende Nachweis von HI-Virusnukleinsäuren dadurch ermöglicht, dass mindestens zwei erfindungsgemäße Oligonukleotide verwendet werden. Bevorzugt werden diese Oligonukleotide als Amplifikationsprimer eingesetzt dergestalt, dass sie beispielsweise jeweils nahe an einem Ende einer der hochkonservierten Regionen hybridisieren und somit bei 60 der Amplifikation (bevorzugt PCR) ein Amplifikationsprodukt erzeugen, welches einem Abschnitt der betreffenden hochkonservierten Region entspricht. Der Nachweis dieses Amplifikationsproduktes und somit der HIV-spezifischen Nukleinsäure kann dann mit Hilfe einer Sonde erfolgen, die entweder eines der als Primer verwendeten Oligonukleotide ist oder ein zusätzliches Oligonukleotid, welches innerhalb der amplifizierten Sequenz hybridisiert. Der Vorteil dieser bevorzugten Ausführungsform ist, dass ein einziges Oligonukleotid oder Primerpaar ausreicht, um subtyp- oder/und speziesübergreifend HI-Viren nachzuweisen.

Statt der Verwendung einer Sonde zum Nachweis des Amplifikationsprodukts können auch beispielsweise DNA-bindende Reagenzien, wie etwa ein DNA-bindender Farbstoff (z. B. Sybergreen) bei der Detektion verwendet werden (WO 97/46707).

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung werden Oligonukleotidkombinationen oder Primerpaare verwendet, von denen jeweils nur ein Oligonukleotidprimer innerhalb einer der konservierten Regionen liegt, während der andere Primer außerhalb liegt, so daß das so erzeugte Amplifikationsprodukt nur teilweise aus einer Basensequenz aus einer der hochkonservierten Regionen besteht. Der letztere Primer ist bevorzugt subtypspezifisch und/oder speziespezifisch, so daß mit einer derartigen Kombination Subtypen oder die Spezies gezielt nachgewiesen werden können.

In diesem Fall werden bevorzugt zwei oder mehr Primerpaare als Oligonukleotidkombination verwendet, wobei mindestens zwei Oligonukleotide jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus einer Sequenz (i), (ii), (iii) oder dazu komplementären Sequenzen, wie oben beschrieben, enthalten. Die Gesamtheit der Primerkombinationen erlaubt somit einen subtyp- oder/und speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine für das erfundungsgemäße Verfahren geeignete Oligonukleotidkombination mindestens zwei, bevorzugt drei Oligonukleotide (z. B. ein Primerpaar oder ein Primerpaar plus Sonde), die jeweils mindestens 10 Nukleotide aus

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

(i) derselben hochkonservierten Region, des gag-Gens oder des pol-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,  
 (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,  
 (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten abgeleiteten Konsensussequenz,

oder dazu komplementären Sequenzen enthalten.

Bevorzugt werden das mindestens eine und bevorzugt die mindestens zwei Oligonukleotid(e) so ausgewählt, dass sie einen subtypübergreifenden Nachweis von HIV-1 ermöglichen, d. h. dass Nukleinsäuren von mindestens 7 der Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H und O von HIV-1, bevorzugt von allen Subtypen erkannt werden.

Bevorzugt werden für den subtypübergreifenden Nachweis mindestens ein und bevorzugt mindestens zwei Oligonukleotid(e) verwendet, die jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

(i) einer hochkonservierten Region des LTR, gag-Gens oder pol-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12 und 13 angegebenen Sequenzen,  
 (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,  
 (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten stammende Konsensussequenz,

oder dazu komplementären Sequenzen enthalten.

Bevorzugt werden zum subtyp- oder/und speziesübergreifenden Nachweis von HIV-1 und HIV-2 mindestens ein und bevorzugt mindestens zwei Oligonukleotid(e) verwendet, die jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

(i) einer hochkonservierten Region des LTR, gag-Gens oder pol-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10 und 13 angegebenen Sequenzen,  
 (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,  
 (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten stammenden Konsensussequenz, oder dazu komplementären Sequenzen enthalten.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass ganz bestimmte Oligonukleotide besonders für das erfundungsgemäße Verfahren geeignet sind. Diese Oligonukleotide sind in den in SEQ ID NO: 14 bis 25 angegebenen Sequenzen dargestellt. Wie bereits eingangs erwähnt, können diese Oligonukleotide aus natürlichen oder synthetischen Nukleinsäurebausteinen bestehen, oder sogar aus der bereits genannten PNA. Bevorzugt trägt mindestens eines der in dem erfundungsgemäßen Verfahren verwendeten Oligonukleotide eine oder mehrere Markierungen. Als Markierungen eignen sich Fluoreszenzmarker oder radioaktive Marker, wie z. B. [<sup>32</sup>P]-markierte Nukleotide.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Oligonukleotid, welches mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

(i) einer hochkonservierten Region des pol-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 4, 5, 9 oder 10 angegebenen Sequenzen,  
 (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,  
 (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten stammenden Konsensussequenz, oder dazu komplementären Sequenzen, oder eine der in SEQ ID NO: 14 bis 25 dargestellten Sequenzen enthält.

Bevorzugt ist das erfundungsgemäße Oligonukleotid eines der in den SEQ ID NO. 14 bis 25 dargestellten Oligonukleotide. Die Länge des erfundungsgemäßen Oligonukleotids beträgt bevorzugt 10 bis 80 Nukleotide. Besonders bevorzugt umfasst es ungefähr 20 bis 30 Basen und weist einen GC-Gehalt von zwischen 40 und 60% auf. Außerdem ist es vorteilhaft, wenn die Oligonukleotide keine Selbstkomplementarität am 3'-Ende aufweisen und darüber hinaus keinen CG-Run am 3'-Ende besitzen. Ein GC-Run ist eine Basenabfolge, die vorwiegend oder ausschließlich aus den Basen C und G besteht. Weiterhin sollten die Oligonukleotide keine Palindrome beinhalten. Die erfundungsgemäßen Oligonukleotide weisen bevorzugt maximal 2 Mismatches zu den entsprechenden mit ihnen hybridisierenden Sequenzen der gleichen Positionen aller Subtypen auf. Bevorzugt weist ein erfundungsgemäßes Oligonukleotid an seinem 3'-Ende keine Mismatches mit Nukleotidsäuren der Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H und O von HIV-1 und/oder der Subtypen A, B, C und D von HIV-2 auf.

Bei Primerpaaren werden die Primer jeweils so gewählt, dass die 5'-Enden der Primer maximal 80 Basen voneinander entfernt positioniert sind, bezogen auf die Regionen, in denen die Primer auf der nachzuweisenden Nukleinsäure hybridisieren werden.

# DE 198 50 186 A 1

disieren. Besonders bevorzugte Primerpaare sind solche, bei denen innerhalb dieses von den Primern amplifizierbaren Bereiches eine weitere HIV-spezifische Sequenz liegt. Diese Sequenz kann dann bevorzugt verwendet werden, um mit Hilfe einer für sie spezifischen Sonde die Amplifikationsprodukte nachzuweisen. Die erfundungsgemäßen Oligonukleotide sind bevorzugt mit mindestens einer der oben genannten Markierungsgruppen versehen.

5 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist somit auch eine Kombination von zwei oder mehr Oligonukleotiden, welche beide die oben genannten erfundungsgemäßen Eigenschaften aufweisen und die in ihrer Gesamtheit für den subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren geeignet sind.

Weiterhin umfaßt die Erfindung Kombinationen von Oligonukleotiden. Bevorzugt sind Kombinationen aus mindestens zwei Oligonukleotiden, die jeweils mindestens 10 aufeinander folgende Nukleotide aus

10 (i) derselben hochkonservierten Region der LTR-Region, des gag-Gens oder des pol-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,  
(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,  
(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten abgeleiteten Konsensussequenz,

15 oder dazu komplementären Sequenzen enthalten.

Noch ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Kombination von mehreren Oligonukleotiden, wobei mindestens zwei erfundungsgemäße Oligonukleotide vorliegen, sowie weitere Oligonukleotide, welche jeweils eine für einen einzigen Subtyp von HIV-1 oder/und HIV-2 spezifische Sequenz enthalten, wobei die Gesamtheit der Oligonukleotide in der Oligonukleotidkombination einen subtyp- oder/und speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren erlaubt.

20 Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Reagenzienkits, der mindestens ein erfundungsgemäßes Oligonukleotid oder eine erfundungsgemäßes Oligonukleotidkombination als Primer oder als Sonden zum Nachweis von HI-Viren oder deren Nukleinsäuren, sowie zur Durchführung einer Hybridisierung und Amplifikation von Nukleinsäuren in einer Probe geeignete Mittel umfasst.

25 Außerdem betrifft die Erfindung die Verwendung von Oligonukleotiden oder Oligonukleotidkombinationen als Primer oder/und Sonden zum Nachweis von HI-Viren, insbesondere zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung in veranschaulichender, aber keinesfalls erschöpfender Weise erläutern.

30

## Beispiele

### Beispiel 1

#### Sensitivität, Spezifität und dynamischer Messbereich anhand einer HIV-Plasma-Verdünnungsreihe

35

Zur Untersuchung von Blutproben wurde RNA aus HIV-positivem Plasma mit einer Ausgangskonzentration von 15.000 Genomäquivalenten (geq) HIV pro ml isoliert. Dieses Plasma wurde sukzessive um den Faktor 10 in negativem Plasma verdünnt und nach Probenvorbereitung jeweils in Doppelbestimmungen mit den entsprechenden Primerpaaren amplifiziert. Als Kontrollen dienten ein HIV-negatives Plasma und Wasser. Zur Bestimmung der Spezifität wurde zusätzlich ein HBV- und ein HCV-positives Plasma mitverarbeitet. Nach Amplifikation wurden alle Proben gemessen (ECL-Detektion, Elecsys® 1010).

40

### 1. Probenvorbereitung

45

Zunächst wurden 420 µl Plasma mit 80 µl Proteinase K (25 mg/ml) gemischt und einige Sekunden gevortext. Dann wurden 500 µl Lysepuffer (5,4 M Guanidinium-Thiocyanat, 10 mM Harnstoff, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X100, pH 4,4) hinzugegeben, der 1 µg Carrier-RNA (PolyA/ml) enthielt. Die Mischung wurde gevortext und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurden 500 µl Isopropanol-MGP hinzugegeben (6 mg magnetische Glaspartikel in Isopropanol). Das Gemisch wurde wieder gevortext und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die MGPs wurden mittels Magnetseparation von der Lösung getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. 750 µl Waschpuffer (20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 70% Ethanol) wurden hinzugegeben, die MGPs wurden durch Vortexen resuspendiert, und es wurde eine erneute Magnetseparation durchgeführt. Der Waschvorgang wurde insgesamt 5 x wiederholt, und schließlich wurden 100 µl DEMC-Wasser zur Elution hinzugegeben. Es wurde 15 Minuten bei 80°C geschüttelt und dann eine weitere Magnetseparation durchgeführt. 10 µl des Eluats wurden 55 für eine RT-PCR eingesetzt.

### 2. Verwendete Primer und Sonden

60

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die verwendeten Primer und Sonden dargestellt sowie deren zugehörige hochkonservierte Region, Position im Genom und das mit Primerpaaren hergestellte Amplifikationsprodukt.

65

Tabelle 1

Primer	Hochkonservierte Region	Position	Amplicon
SK 462 *		1359-1388 (30) 1474-1500 (27) 1402-1421 (20)	142 bp
SK 431 *			
SK 102			
RAR 1032*		2961-2992 (32)	169 bp
RAR 1033*		3097-3129 (33)	
RAR 1034*		2997-3031 (35)	
GH A2F** (SEQ ID NO. 14)	SEQ ID NO. 8	4143-4162 (20)	
GH A2R** (SEQ ID NO. 15)		4180-4205 (26)	63 bp
GH A2P** (SEQ ID NO. 16)		4162-4179 (18)	
GH A3F** (SEQ ID NO. 17)	SEQ ID NO. 10	4644-4663 (20)	
GH A3R (SEQ ID NO. 18)		4677-4702 (26)	59 bp
GH A3P (SEQ ID NO. 19)		4663-4677 (15)	
GH A4F** (SEQ ID NO. 20)	SEQ ID NO. 11	4889-4912 (24)	
GH A4R** (SEQ ID NO. 21)		4932-4951 (20)	63 bp
GH A4P** (SEQ ID NO. 22)		4913-4931 (19)	
GH A6F** (SEQ ID NO. 23)	SEQ ID NO. 13	4412-4437 (26)	
GH A6R** (SEQ ID NO. 24)		4461-4485 (25)	74 bp
GH A6P (SEQ ID NO. 25)		4438-4460 (23)	

\* Diese Primer sind jeweils publizierte Primer und Sonden von Roche

\*\* Diese Primer sind neue Primer aus der *pol*-Region des HIV-Genoms entsprechend den in Tabelle 1 genannten hochkonservierten Bereichen.

### 3. Amplifikationsmix und Thermocycler-Protokoll für die RT-PCR

#### Mastermix

60

Reagenzien	Endkonzentration im Mastermix
5 x Bicin-Puffer	1 x
MnOAc	2,5 mM
dNTPs (einschließlich dUTP)	200 µM/600 µM
Vorwärtsprimer	0,3 µM
Rückwärtsprimer (biotinyliert)	0,3 µM
Tth-Polymerase	10 Einheiten

65

# DE 198 50 186 A 1

Reagenzien  
UNG  
Gesamtvolumen: Endkonzentration im Mastermix  
2 Einheiten  
100  $\mu$ l

5

Cycler: 10 Minuten, 37°C: UNG-Dekontaminierung  
30 Minuten, 60°C, Reverse Transkription  
30 Sekunden, 95°C: Denaturierung  
10 5 Zyklen 15 Sekunden, 95°C: Denaturierung  
20 Sekunden, 50°C: Hybridisieren/Elongation  
30 Zyklen 15 Sekunden, 94°C: Denaturierung  
20 Sekunden, 60°C: Hybridisierung/Elongation  
15 7 Minuten, 72°C: endgültige Elongation  
Halten bei 50°C

## 4. Detektion

20 Die gesamte Detektionsreaktion erfolgte voll automatisiert mit Hilfe eines Elecsys® 1010-Analyse-Automaten. Zunächst wurden 10  $\mu$ l Amplifikat und 35  $\mu$ l Denaturierungslösung (BM-ID-Nr. 1469053, Boehringer Mannheim) entnommen. In einem Reaktionsgefäß wurde für 5 Minuten bei 37°C inkubiert, und dann wurden 120  $\mu$ l Hybridisierungslösung (BM-ID-Nr. 1469045, Boehringer Mannheim versetzt mit 25 ng/ml Ruthenium-markierter Sonde) hinzugegeben. Es wurde wiederum für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden 35  $\mu$ l einer Elecsys® SA Magnetbeadlösung 25 hinzugegeben (BM-ID-Nr. 1719556, Boehringer Mannheim). Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Elektrochemilumineszenz von 120  $\mu$ l des Reaktionsgemisches wurde in der Elecsys® 1010-Messzelle gemessen. Zur Hybridisierung wurden die entsprechenden Ruthenium-markierten Sonden laut Tabelle 1 verwendet.

## 5. Ergebnisse

30 Ergebnis (ECL-counts  $\times 100$ )

Templat	SK-Primer	RAR-Primer	GH-A2	GH-A3	GH-A4	GH-A6
HIV 15000 Kopien/ml	5763	294	5786	4209	7981	6809
HIV 1500 Kopien/ml	626	38	724	466	899	999
HIV 150 Kopien/ml	184	14	86	164	117	122
HIV 15 Kopien/ml	58	9	13	27	25	10
HIV 1,5 Kopien/ml	49	9	14	32	14	10
HIV-negatives Plasma	70	9	22	38	16	11
HCV-positives Plasma	49	9	5	58	16	10
HBV-positives Plasma	37	9	5	81	17	10
Wasser	12	9	16	35	15	10

35 Die Signale der neuen Primer zeigen gegenüber den Referenzen eine ähnliche Sensitivität. Es erfolgt eine sehr gute Signalabstufung innerhalb der Verdünnungsreihe.

40 Der erhöhte Background bei den Primerpaaren SK und GH-A3 ist vermutlich auf ein nicht optimales Amplifikations-  
50 protokoll zurückzuführen.

55

60

65

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:  
 (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH  
 (B) STRASSE: Sandhofer Strasse 112-132  
 (C) ORT: Mannheim-Waldhof  
 (E) LAND: DE  
 (F) POSTLEITZAHL: 68305

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neue Primer und Sonden zum Nachweis von HIV

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 25

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:  
 (A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
 (B) COMPUTER: IBM PC compatible  
 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 62 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: beides  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:  
 AGGGAACCCA CTGCTTAAGC CTCAATAAAG CTTGCCTTGA GTGCTTCAAG TAGTGTGTGC

CC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 62 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: beides  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:  
 TTTGACTAGC GGAGGCTAGA AGGAGAGAGA TGGGTGCGAG AGCGTCAGTA TTAAGCGGGG

GA

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 62 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: beides  
 (D) TOPOLOGIE: linear

DE 198 50 186 A 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ATTTTAAAAG CATTGGGACC AGCGGCTACA CTAGAAGAAA TGATGACAGC ATGTCAGGGA 60  
5 GT 62

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
10 (A) LÄNGE: 54 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: beides  
(D) TOPOLOGIE: linear

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

20 CTAAAGGAAG CTCTATTAGA TACAGGAGCA GATGATACAG TATTAGAAGA AATG 54  
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

25 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 59 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: beides  
(D) TOPOLOGIE: linear

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

35 TGGAAACCAA AAATGATAGG GGGATTGGA GGTTTTATCA AAGTAAGACA GTATGATCA 59  
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

40 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 65 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: beides  
(D) TOPOLOGIE: linear

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

50 ACTGTACCAAG TAAAATTAAA GCCAGGAATG GATGGCCCAA AAGTTAAACA ATGGCCATTG 60  
ACAGA 65

55 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

60 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 53 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: beides  
(D) TOPOLOGIE: linear

65

DE 19850186 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CAATACATGG ATGATTGTA TGTAGGATCT GACTTAGAAA TAGGGCAGCA TAG

53

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 77 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

10

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

AAGGAAAAGG TCTATCTGGC ATGGGTACCA GCACACAAAG GAATTGGAGG AAATGAACAA

60

20

77

GTAGATAAAAT TAGTCAG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 67 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AAATAGTAGC CAGCTGTGAT AAATGTCAGC TAAAAGGAGA AGCCATGCAT GGACAAGTAG

60

67

ACTGTAG

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CAGGAATTG GAATTCCCTA CAATCCCCAA AGTCAAGGAG TAGTGAATC TATGAATAA

59

55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 101 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

60

65

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

DE 198 50 186 A 1

AAAATTCAAA ATTTTCGGGT TTATTACAGG GACAGCAGAA ATCCACTTG GAAAGGACCA 60  
GCAAAGCTCC TCTGGAAAGG TGAAGGGCA GTAGTAATAC A 101

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 62 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
10 (C) STRANGFORM: beides  
(D) TOPOLOGIE: linear

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:  
AGGGATTATG GAAAACAGAT GGCAGGTGAT GATTGTGTGG CAAGTAGACA GGATGAGGAT 60  
20 TA 62

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

25 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 97 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: beides  
(D) TOPOLOGIE: linear

30

35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:  
TGGCAACTAG ATTGTACACA TTTAGAAGGA AAAGTTATCC TGGTAGCAGT TCATGTAGCC 60  
AGTGGATATA TAGAAGCAGA AGTTATTCCA GCAGAAA 97

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
45 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:  
TACCTGGCAT GGGTACCA 20

55 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
60 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

65 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GACTAATTAA TCTACTTGTTC CATTTC

26

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

15

CACACAAAGG AATTGGAG

18

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

30

TTTGGAAATTC CCTACAATCC

20

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

45

AATTCTTTAT TCATAGATTC TACTAC

26

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

60

CCCAAAGTCA AGGAG

15

65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

DE 198 50 186 A 1

5

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

TCAAAATTTT CGGGTTTATT ACAG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

15

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

20

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

AGCTTTGCTG GTCCTTTCCA

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

30

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

35

40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

GGACAGCAGA AATCCACTT

19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

45

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

50

55 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

GCAACTAGAT TGTACACATT TAGAAG

26

60 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

65

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

CTTCTATATA TCCACTGGCT ACATG

25

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

GAAAAGTTAT CCTGGTAGCA GTT

23

20

## Patentansprüche

1. Verfahren zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von Nukleinsäuren von HI-Viren in einer Probe durch

25

Hybridisierung der Nukleinsäuren mit einer Oligonukleotidkombination, umfassend zwei oder mehr mit HIV-Nukleinsäuren spezifisch hybridisierende Oligonukleotide, die jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

(i) einer hochkonservierten Region der LTR-Region, des gag-Gens oder des pol-Gens von HIV, dargestellt

30

durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,

(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,

(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten abgeleiteten Konsensussequenz,

oder dazu komplementären Sequenzen enthalten, und

Durchführung eines Amplifikationsschrittes.

35

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Schritte umfaßt:

(a) Inkontaktbringen einer Probe mit den Oligonukleotiden unter Bedingungen, bei denen eine Hybridisierung der Oligonukleotide mit in der Probe vorhandenen HIV-Nukleinsäuren aus HIV-1 oder/und HIV-2 erfolgt,

(b) Bestimmen des Vorhandenseins und/oder der Menge von HIV-Nukleinsäuren in der Probe.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine einzige Oligonukleotidkombination verwendet wird.

40

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur Amplifikation von HIV-Nukleinsäuren zwei oder mehr Oligonukleotidkombinationen verwendet werden, jede Oligonukleotidkombination umfassend ein erstes Oligonukleotid, das mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus einer Sequenz nach Anspruch 1 (i), (ii), (iii) oder dazu komplementären Sequenzen enthält, und ein zweites Oligonukleotid, das eine subtyp- und/oder speziespezifische Hybridisierung mit HIV-Nukleinsäuren ermöglicht, wobei die Gesamtheit der Oligonukleotidkombinationen einen subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren erlaubt.

45

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß eine Oligonukleotidkombination verwendet wird, bei der mindestens zwei Oligonukleotide jeweils mindestens 10 aufeinander folgende Nukleotide aus

(i) derselben hochkonservierten Region der LTR-Region, des gag-Gens oder des pol-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,

50

(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,

(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten abgeleiteten Konsensussequenz,

oder dazu komplementären Sequenzen enthalten.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß zum subtypübergreifenen Nachweis die Oligonukleotide so ausgewählt werden, daß mindestens 7 der Subtypen von HIV-1, ausgewählt aus den Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H und O mindestens 2 der Subtypen von HIV-2, ausgewählt aus den Subtypen A, B, C und D detektiert werden.

55

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis mindestens zwei Oligonukleotide verwendet werden, die jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

60

(i) einer hochkonservierten Region des LTR, gag-Gens oder pol-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12 und 13 angegebenen Sequenzen,

(ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,

(iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten stammende Konsensussequenz,

oder dazu komplementären Sequenzen enthalten.

65

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß zum speziesübergreifenden Nachweis die Oligonukleotide so ausgewählt werden, daß mindestens 7 der Subtypen von HIV-1, ausgewählt aus den Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H und O, sowie zusätzlich mindestens einer der Subtypen von HIV-2, ausgewählt aus den Subtypen A, B, C und D detektiert werden.

# DE 198 50 186 A 1

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis mindestens zwei Oligonukleotide verwendet werden, die jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

- (i) einer hochkonservierten Region des LTR, gag-Gens oder pol-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10 und 13 angegebenen Sequenzen,
- (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
- (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten stammenden Konsensussequenz, oder dazu komplementären Sequenzen enthalten.

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide die in SEQ ID NO: 14 bis 25 angegebenen Sequenzen aufweisen oder enthalten.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Oligonukleotid eine oder mehrere Markierungen aufweist.

12. Oligonukleotid, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

- (i) einer hochkonservierten Region des pol-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 4, 5, 9 oder 10 angegebenen Sequenzen,
- (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
- (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten stammenden Konsensussequenz, oder dazu komplementären Sequenzen, oder eine der in SEQ ID NO: 14 bis 25 dargestellten Sequenzen enthält.

13. Oligonukleotid nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es 10 bis 80 Nukleotide umfaßt.

14. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß es an seinem 3'-Ende keine Mismatches mit Nukleinsäuren der Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H und O von HIV-1 und der Subtypen A, B, C und D von HIV-2 aufweist.

15. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es eine oder mehrere Markierungen aufweist.

16. Kombination von mehreren Oligonukleotiden, umfassend mindestens zwei Oligonukleotide, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens zwei Oligonukleotide jeweils mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleotide aus

- (i) derselben hochkonservierten Region der LTR-Region, des gag-Gens oder des pol-Gens von HIV, dargestellt durch eine der in SEQ ID NO: 1 bis 13 angegebenen Sequenzen,
- (ii) einer entsprechenden Region eines anderen HI-Virusisolats,
- (iii) einer entsprechenden Region einer aus mehreren HI-Virusisolaten abgeleiteten Konsensussequenz, oder dazu komplementären Sequenzen enthalten.

17. Kombination von mehreren Oligonukleotiden, umfassend mindestens zwei Oligonukleotide, ausgewählt aus den Oligonukleotiden nach einem der Ansprüche 12 bis 15, und gegebenenfalls weitere Oligonukleotide, welche jeweils eine für einen einzigen Subtyp von HIV-1 und/oder HIV-2 spezifische Sequenz enthalten, wobei die Gesamtheit der Oligonukleotide einen subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren erlaubt.

18. Reagenzienkit, umfassend ein Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 12 bis 15 oder eine Oligonukleotidkombination nach Anspruch 16 oder 17 als Primer und/oder Sonden zum Nachweis von HI-Viren oder deren Nukleinsäuren, sowie zur Durchführung einer Hybridisierung und Amplifikation von Nukleinsäuren in einer Probe geeignete Mittel.

19. Verwendung von Oligonukleotiden oder Oligonukleotidkombinationen nach einem der Ansprüche 12 bis 17 als Primer und/oder Sonden zum subtyp- und/oder speziesübergreifenden Nachweis von HI-Viren.